

## Functional analysis of Nogo in nucleic acid-sensing TLR pathways

著者	木村 俊文
号	13
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第303号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/60343">http://hdl.handle.net/10097/60343</a>

	きむら としふみ
氏 名（本 籍 地）	木村 俊文
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第303号
学位授与年月日	平成27年4月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	Functional analysis of Nogo in nucleic acid-sensing TLR （核酸を認識する TLR 経路における Nogo の機能解析）
博士論文審査委員	（主査） 教 授 高井 俊行 教 授 水野 健作 教 授 福田 光則

## 論文内容の要旨

### <背景>

Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) は病原体構成成分をリガンドとして認識し、細胞内シグナル伝達分子を活性化して炎症性遺伝子の発現を誘導する。TLR を介した自然免疫応答の開始とそれに引き続く獲得免疫応答の惹起は感染微生物の排除に極めて重要である。ヒトには 10 種類、マウスには 12 種類の TLR ファミリー分子が存在するが、それらは細胞膜表面に発現してリポ多糖やリポタンパク質を認識するもの (細胞表面 TLR) と、細胞内のエンドソームやリソソーム (エンドリソソーム) 膜上で DNA や RNA を認識するもの (核酸認識 TLR) に大別できる。核酸認識 TLR はウイルスなどに対する防御に不可欠な一方で自己由来の核酸にも反応しうるため、生合成の場である小胞体からエンドリソソームへの受容体の輸送やプロセシングによる成熟は厳密な調節を受けている。これまでに幾つかの小胞体膜タンパク質が TLR のシャペロン分子やプロセシングに必要な分子として同定されたものの、核酸認識 TLR の細胞内局在を制御する機構には不明な点が多い。

reticulon ファミリーの分子は小胞体に局在する膜タンパク質であり、哺乳類では reticulon 1 から 4 までの 4 つの分子が同定されている。それらの機能については未知の点も多いが、免疫受容体を含むレセプターやトランスポーターの輸送に関与することが報告されている。中枢神経系における軸索伸長を制御する因子として同定された reticulon 4 (Nogo) には 3 つのアイソフォーム (Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C) が存在する。Nogo は神経系だけでなくマクロファージをはじめとする自然免疫細胞にも高発現しているが、免疫応答における機能は明らかでない。ところが、当研究室が同定した抑制性免疫受容体である Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) が神経系において Nogo-A と結合すると報告された。PirB は TLR9 下流のシグナル経路を抑制することから、Nogo は PirB と同様に TLR シグナル経路の制御因子であると考えられた。

本研究では、免疫応答における Nogo の機能を検討するため、Nogo と PirB を高発現するマクロファージの TLR 応答と TLR の細胞内局在性に着目し、Nogo-A/B 欠損マウスを用いて解析を行った。

### <結果>

まず、骨髄細胞から *in vitro* で誘導したマクロファージを用いて、各 TLR 刺激に伴って発現誘導される interleukin (IL)-6 の産生、nuclear factor- $\kappa$ B 及び MAP kinase の活性化を指標として、TLR 経路における Nogo の関与を検討した。細胞表面 TLR に対する刺激の場合、Nogo-A/B 欠損マクロファージは野生型細胞と同程度に応答した。しかし、TLR3、7、9 などの核酸認識 TLR への刺激に対しては、Nogo-A/B 欠損マクロファージは著しい応答不全を示した。つまり Nogo は核酸に対する免疫応答に必要な分子であると判明した。他方で Nogo の各アイソフォームのマクロファージにおける発現パターンを解析したところ、Nogo-B が高発現して

いたものの Nogo-A は mRNA、タンパク質いずれにおいてもほとんど検出されなかった。従って Nogo-A/B 欠損マクロファージで見出された核酸刺激に対する応答不全は、Nogo-B の欠損に起因するといえる。次にマウス個体レベルでの免疫応答を評価したが、Nogo-A/B 欠損マウスでは TLR3 リガンド投与によって誘導される血清中 IL-6 や IL-12 の濃度上昇が野生型マウスと比較して有意に減弱していた。これらの結果から、*in vitro* 及び *in vivo* において Nogo-B が核酸刺激に伴う TLR 応答を促進することが明らかになった。

当初、Nogo-B は PirB との結合を介して TLR 応答を制御すると考えた。ところが、マクロファージの細胞溶解液を用いて免疫沈降実験を行った結果、予想と異なり Nogo-B と PirB の結合は確認できなかった。すなわち神経系における Nogo-A と PirB の会合による軸索伸長制御と異なり、免疫系では Nogo-B は PirB とは独立に TLR 応答を制御することが示唆された。

細胞表面 TLR のリガンドと異なり、核酸認識 TLR のリガンドが受容体に認識されるには細胞に取り込まれてエンドリソソームに輸送される必要がある。Nogo-A/B 欠損マクロファージにおける TLR9 リガンドの取り込み能力とエンドリソソームへの移行を観察したが、いずれも野生型細胞と同程度であり、Nogo-B を欠損したことによる影響は認められなかった。一方で核酸認識 TLR は小胞体で合成された後、ゴルジ体経由でエンドリソソームへ移行し、プロセッシングを受けることで成熟型となる。TLR の局在を評価するため、レトロウイルスを用いて GFP 融合 TLR9 をマクロファージに発現させ、同時にエンドリソソームを染色することで両者の共局在を観察した。その結果、Nogo-A/B 欠損細胞では TLR9 のエンドリソソームへの局在が低下しており、同様の観察結果は内在性 TLR9 を抗体染色する実験からも確認された。つまり Nogo-B は TLR9 のエンドリソソームへの輸送に必要であると示唆された。他の核酸認識 TLR も TLR9 と類似した機構で局在制御を受けるとされるため、Nogo-A/B 欠損細胞で見られる TLR3 や TLR7 経路の応答不全も同様に受容体の細胞内局在の異常によるものと考えられる。

これまでの報告から、Nogo-B は他の分子をエフェクターとして用いて TLR の輸送に関与すると推測した。そこで FLAG タグ融合 Nogo-B タンパク質をマクロファージ様細胞株に安定発現させ、その細胞溶解液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、質量分析による解析を行って Nogo-B 結合タンパク質として新たに Gram domain containing 4 (GRAMD4) を得た。GRAMD4 の免疫応答における機能は知られていないが、その発現量は定常状態では低い状態であり、TLR 刺激依存的に発現誘導されることが明らかになった。マクロファージ様細胞株における GRAMD4 のノックダウン及び過剰発現実験を行ったところ、ノックダウンによって核酸認識 TLR 応答は亢進し、過剰発現によって応答は抑制された。この結果から GRAMD4 は核酸認識 TLR 経路を負に制御することが示唆された。また、野生型マクロファージにおける GRAMD4 のノックダウンによって核酸認識 TLR 応答が亢進したが、Nogo-A/B 欠損マクロファージでノックダウンした場合、より顕著な応答の亢進が観察された。つまり野生型細胞では Nogo-B が GRAMD4 の抑制的作用を阻害しているため GRAMD4 のノックダウンによる影響は部分的なものであった一方、Nogo-A/B 欠損細胞では Nogo-B による阻害を受けない GRAMD4 が恒常的に核酸認識 TLR 経路を

抑制しているためノックダウンによって強い影響が現れたと考えられる。

続いて GRAMD4 が核酸認識 TLR 応答を制御する分子機構を検討した。その結果、小胞体からゴルジ体への小胞輸送を制御する small GTPase である Rab1A が GRAMD4 と相互作用することが見出された。Rab1A が TLR の局在変化に関与するという報告はないが、GRAMD4 が Rab1A に会合してその活性を調節すること、及び Nogo が GRAMD4 に結合して GRAMD4 の抑制的機能を阻害する可能性が示された。

#### <考察>

GRAMD4 の発現量は通常は低レベルにあり、Nogo-B はその結合を介して GRAMD4 の抑制的作用を十分に阻害し、TLR の恒常的な局在変化を維持していると推測できる。これは、Nogo-A/B 欠損マクロファージにおける GRAMD4 のノックダウンによる TLR 応答への影響が、野生型細胞のそれよりも著しく強いことから示唆される。一方で TLR 刺激により発現誘導された GRAMD4 は Nogo-B による抑制を乗り越え、Rab1A に結合して核酸認識 TLR の輸送を負に制御するようになると考えられる。

核酸認識 TLR は宿主防御に重要な反面、その自己由来リガンドへの反応性により、しばしば自己免疫疾患発症と増悪の原因となる。そのため核酸認識 TLR の活性化は厳密に制御されるはずである。TLR の局在変化に関与する分子は報告されているものの、その詳細な制御機構は知られていなかった。本研究の結果から、TLR リガンドの認識によって活性化した自然免疫細胞では GRAMD4 が発現誘導され、Rab1A に結合してその活性を制御し、核酸認識 TLR のエンドリソソームへの移行を阻害することが示唆された。エンドリソソームに存在する受容体を減少させることで炎症応答を終息させ、自己免疫疾患の素地となる炎症状態の持続を阻止していると考えられる。その一方で定常状態の細胞では Nogo-B が GRAMD4 を抑制し、TLR のエンドリソソームへの輸送を維持して恒常的な感染防御を可能にしていると考えられる。本研究が明らかにした Nogo-B と GRAMD4 による核酸認識 TLR の局在制御機構によって宿主は個体恒常性を維持しており、より詳細な分子機構を究明することで細菌・ウイルス感染や自己免疫疾患の病態理解に貢献するターゲットとなりうると期待される。

## 論文審査結果の要旨

この度審査を受けた博士論文において、論文提出者である木村俊文は Nogo の免疫応答における機能解析を目的として研究を行った。Nogo は神経線維の再編成における制御因子として知られ、近年は免疫受容体との結合が報告されたものの免疫細胞における機能は不明であった。Nogo が自然免疫細胞に特に高発現すること、及び感染防御や自己免疫疾患等における自然免疫の寄与を木村は重要視し、自然免疫応答に着目して一連の免疫学・分子細胞生物学的解析を木村は立案して実施した。

解析の結果、木村は Nogo が自然免疫機構の中でも核酸認識 TLR の細胞内局在制御に不可欠であることを見出した。神経系における機能に注目されてきた Nogo が免疫応答に関係するという知見は独自性の強い発見である。核酸認識 TLR 応答は生体防御や一部の免疫疾患に深く関与しているが、その制御機構は解析が進んでいない。木村は Nogo による TLR 局在制御の分子メカニズムを解明すべく検討したところ、意外にも先述の Nogo 結合性免疫受容体とは独立の機構であるという結果を得た。Nogo が単独で TLR の局在を調節するとは考えづらいという木村の意見により、Nogo のエフェクター分子を探索すべく、Nogo 結合分子のプロテオミクス解析に取り組み、新たに GRAMD4 を同定した。GRAMD4 の免疫応答における機能は全く不明であったが、細胞を用いた解析により、木村は GRAMD4 が核酸認識 TLR 経路の抑制因子であることを明らかにした。本研究によって得られた知見を統合し、Nogo は GRAMD4 と会合してその抑制的作用の発現を阻害するという独創的モデルを木村は提唱するに至った。

本研究で扱った Nogo と GRAMD4 による TLR 応答制御機構は全く新規の発見であると同時に、感染防御や自己免疫疾患の病態理解等に大きく貢献することが期待できる。また研究方針の立案、解析系の構築と実施、論文執筆は木村が主体的に行ったものである。以上の研究過程と新規性のある研究結果は、木村が自立した研究活動の遂行に必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、木村が提出した論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。